

# ИДЕНТИФИКАЦИЯ БИОМАРКЕРОВ V-ГАЗОВ В БИОЖИДКОСТЯХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

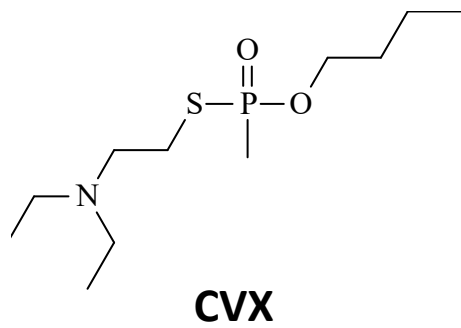
Родин И.А.<sup>1</sup>, Браун А.В.<sup>1</sup>, Рыбальченко И.В.<sup>1</sup> Байгильдиев Т.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>. МГУ имени М.В. Ломоносова, ул. Ленинские Горы, 1, 119991, Москва, Россия  
avbraun@yandex.ru

## Актуальность темы

V-газы являются высокотоксичными фосфорорганическими соединениями (ФОВ), которые, при попадании в живой организм, вызывают тяжелые отравления за счет ингибирования ацетилхолинэстеразы. В связи с этим их производство, накопление и применение запрещено Конвенцией по запрещению химического оружия, которая вступила в силу в 1997 году. Однако, за последние два десятилетия отмечено применение токсичных химикатов в ходе военных конфликтов (Ирак, Сирия), также существует угроза использования ФОВ в террористических целях. Данные примеры показывают, что создание высокочувствительных аналитических подходов для установления фактов воздействия ФОВ на человека является актуальной задачей в рамках исследований возможного применения ФОВ.

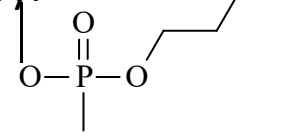
# Объекты исследования – биомаркеры интоксикации плазмы нервно-паралитическими отравляющими веществами V-типа



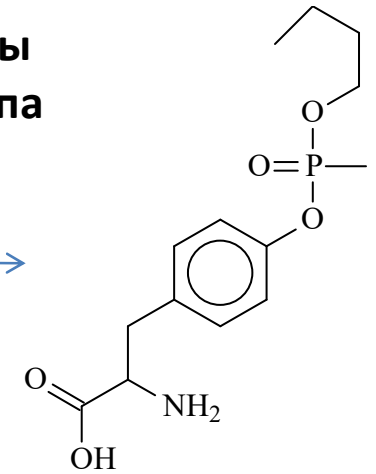
Плазма  
связывание

Альбумин

Tyr

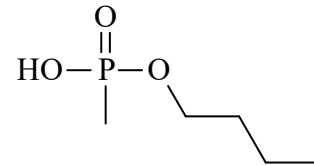


Проназа  
гидролиз



Тирозиновый аддукт VR  
**(TCVX)**

Моча  
гидролиз

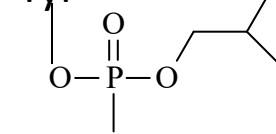


н-Бутил метилфосфонат **(BMFA)**

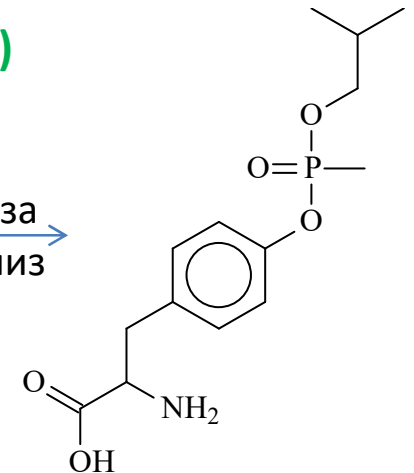
Плазма  
связывание

Альбумин

Tyr

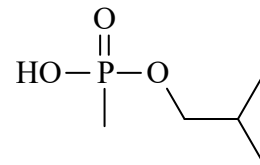


Проназа  
гидролиз

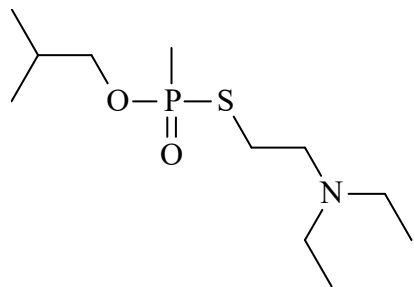


Тирозиновый аддукт CVX  
**(TVR)**

Моча  
гидролиз



Изобутил метилфосфонат **(IBMFA)**



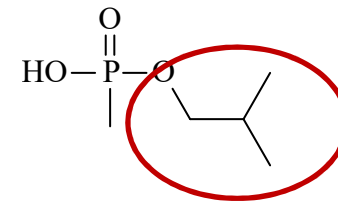
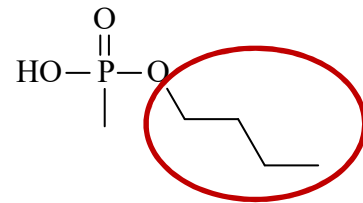
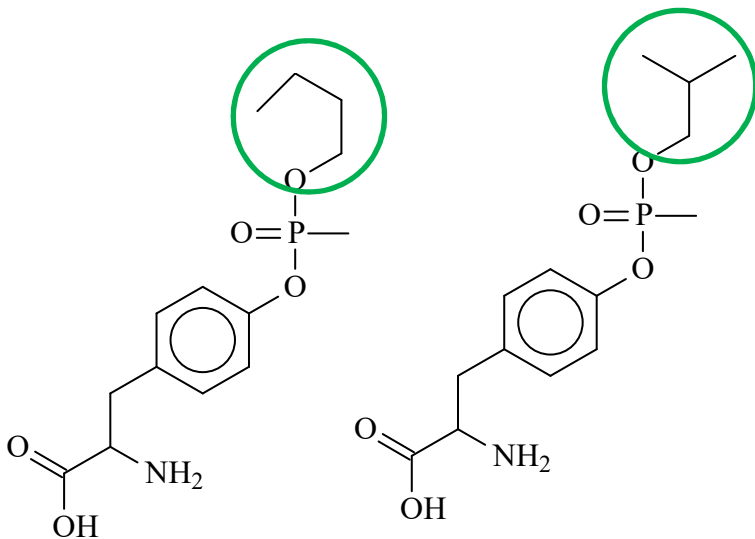
**VR**

## Методы исследования

- Подготовка проб с использованием твердо фазной экстракции и ферментативного гидролиза
- Высокоэффективная жидкостная хроматография (разделение компонентов)
- Tandemная масс-спектрометрия высокого разрешения

## Особенности идентификации

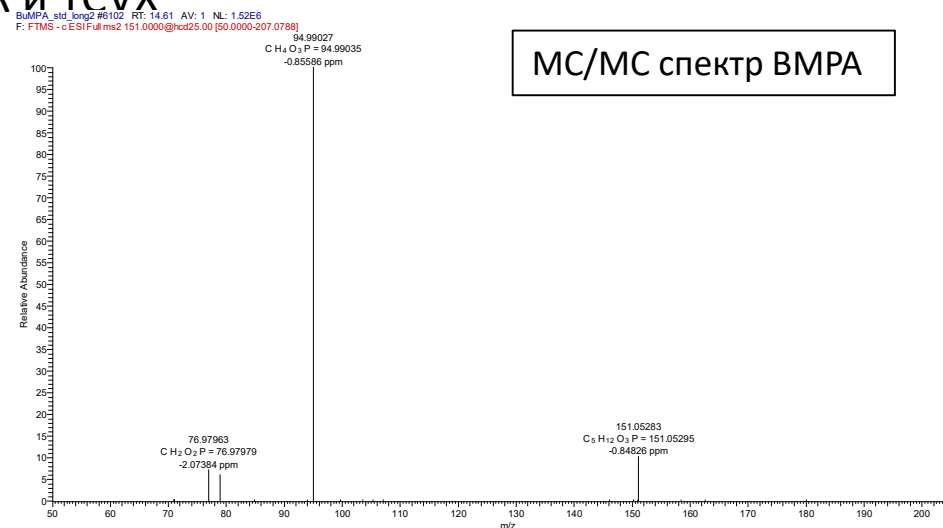
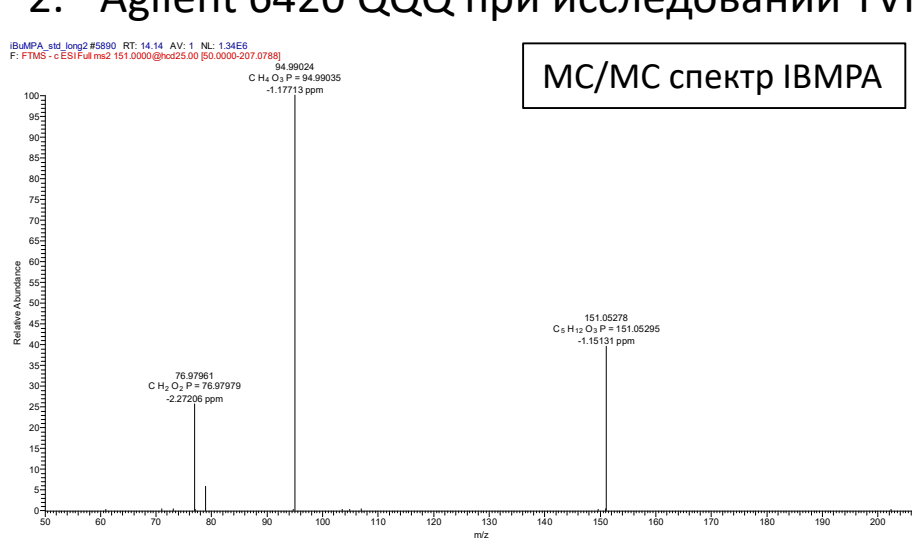
1. Изомеры (качественно, имеют одинаковые пути фрагментации)
2. Имеют близкие времена удерживания в варианте обращено-фазовой ВЭЖХ



# Выбор условий масс-спектрометрического детектирования

Оборудование:

1. Orbitrap Fusion Lumos (высокое разрешение) при исследовании ВМРА и ИВМРА
2. Agilent 6420 QQQ при исследовании TVR и TCVX



## Характеристики выбранных ионных реакций биомаркеров

Биомаркер	Ионная реакция, $m/z$	Тип ионной реакции	Соотношение интенсивностей сигналов, %
ИВМРА	151.05→94.99035	Количеств. оценка	100
ИВМРА	151.05→76.97979	Подтверждение	25.7±6.4
ВМРА	151.05→94.99035	Количеств. оценка	100
ВМРА	151.05→76.97979	Подтверждение	7.2±3.6
TVR	316→214	Количеств. оценка	100
TVR	316→260	Подтверждение	69.2±13.8
TCVX	316→214	Количеств. оценка	100
TCVX	316→260	Подтверждение	41.5±10.4

## Условия хроматографического разделения

Параметр	Разделение IBMA, BМРА, TVR, TCVX
Тип колонки	Thermo Acclaim 120 C18 (250 мм x 2.1 мм), диаметр зерна сорбента 3 мкм (Thermo Scientific, США)
Состав подвижной фазы	А – 0.1 % муравьиная кислота в воде Б - 0.1 % муравьиная кислота в ацетонитриле
Программа элюирования	0 – 1.5 мин: 95 % А; 1.5 – 33 мин: 5 – 80 % Б; 33 – 35 мин: 80 % Б; 35 – 40 мин: 95 % А

### Параметры хроматографического разделения IBMA, BМРА, TVR, TCVX

Параметр	Значение
Объем вводимой пробы, мл	0.020
Время удерживания IBMPA, мин	14.14±0.20
Время удерживания BMPA, мин	14.60±0.20
Время удерживания TVR, мин	34.41±0.20
Время удерживания TCVX, мин	35.03±0.20
Коэффициент емкости IBMPA	6.4
Коэффициент емкости BMPA	6.7
Коэффициент емкости TVR	17.1
Коэффициент емкости TCVX	17.4
Число теорет. тарелок для IBMPA, ТТ/м	12000
Число теорет. тарелок для BMPA, ТТ/м	13200
Число теорет. тарелок для TVR, ТТ/м	240000
Число теорет. тарелок для TCVX, ТТ/м	245000

## Условия подготовки проб плазмы и мочи к анализу

**Подготовка проб для обнаружения аддуктов TVR и TCVX.** К образцу плазмы крови объемом  $1.0 \text{ см}^3$  добавляли  $1.0 \text{ см}^3$   $15 \text{ мг/см}^3$  проназы в  $25 \text{ мМ}$  гидрокарбоната аммония (Protease from *Streptomyces griseus*, Sigma, P6911) и выдерживали пробу в течение 12 час при  $37^\circ\text{C}$ . Для устранения избытка ферментов раствор фильтровали через Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Units (10k, Millipore) и центрифугировали в течение 15 мин при  $10000 \text{ g}$ . Надосадочную жидкость пропускали через сорбент ISOLUTE SPE Columns C8 (100 mg, 3 ml), предварительно кондиционированный ацетонитрилом ( $2 \times 1.0 \text{ см}^3$ ) и водой ( $2 \times 1.0 \text{ см}^3$ ). Сорбент промывали водой ( $3 \times 0.5 \text{ см}^3$ ). Целевые вещества элюировали 50% раствором ацетонитрила в воде ( $2 \times 0.5 \text{ см}^3$ ) и 60% раствором ацетонитрила в воде ( $2 \times 0.5 \text{ см}^3$ ). Элюат упаривали досуха при  $45^\circ\text{C}$  в испарителе (TurboVar) и перерастворяли в  $0.1 \text{ см}^3$  5% раствора ацетонитрила в воде. Аликвоту объемом  $0.020 \text{ см}^3$  анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

**Подготовка проб для обнаружения VMRA и IBMRA.** 1 мл мочи упаривали досуха при  $70^\circ\text{C}$  в токе азота на установке концентрирования TurboVar. Сухой остаток экстрагировали дважды  $1 \text{ см}^3$  5% воды в ацетонитриле. Объединенный экстракт пропускали через сорбент Chromabond SiOH columns (100 mg, 1ml), предварительно кондиционированный  $1.0 \text{ см}^3$  25% воды в ацетонитриле и  $1.0 \text{ см}^3$  ацетонитрилом. Образец промывали  $1.0 \text{ см}^3$  10% воды в ацетонитриле и элюировали  $1.0 \text{ см}^3$  25% воды в ацетонитриле. Элюат упаривали досуха в токе азота при  $70^\circ\text{C}$ . Осадок перерастворяли в  $150 \text{ мкл}$  5% раствора ацетонитрила в воде. Аликвоту объемом  $0.020 \text{ см}^3$  анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

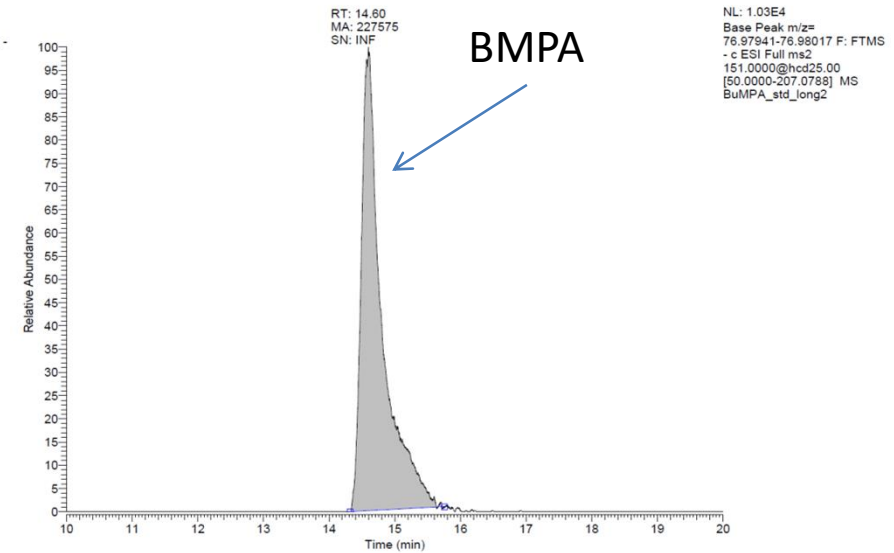
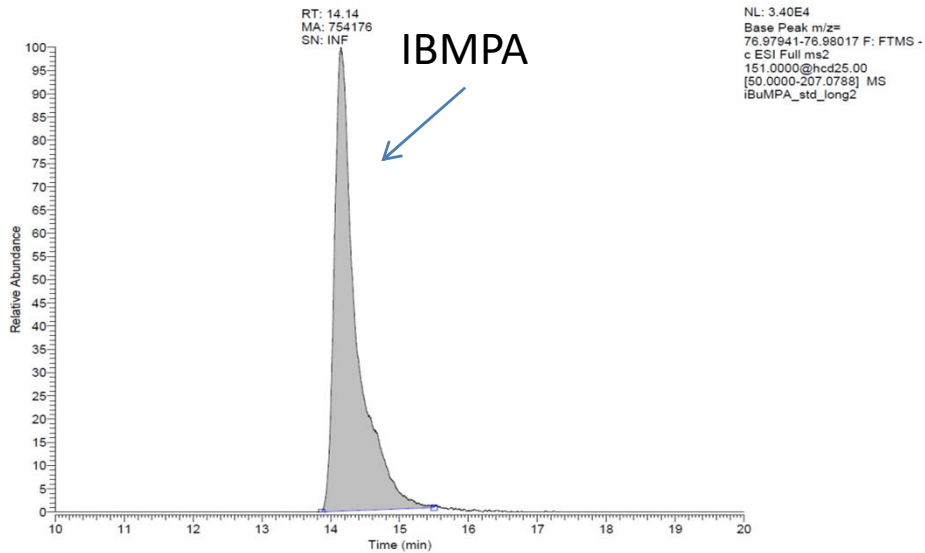
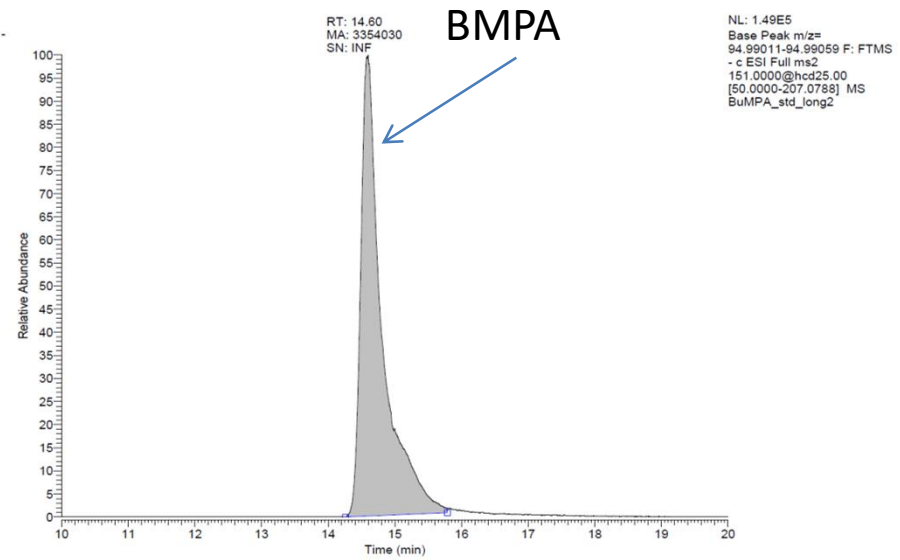
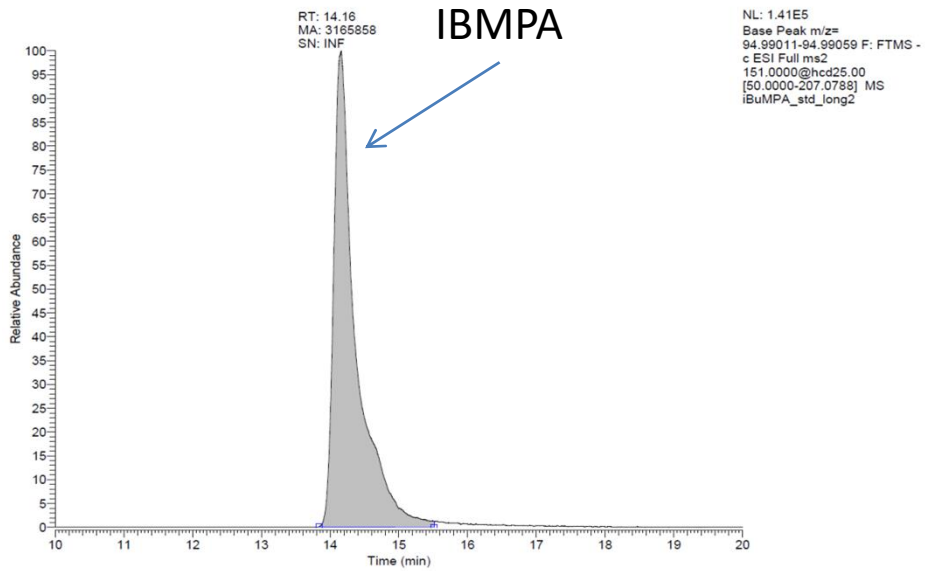
## Апробация на реальных объектах

Метрологические характеристики определения VR и CVX в виде биомаркеров ВМРА, ИВМРА, TVR и TCVX (P = 0.95, n = 3).

Метаболит	Тип биожидкости	Диапазон концентраций, нг/мл	Уравнение градуировочного графика	Коэффициент корреляции	Матричный эффект, %	Предел обнаружения, нг/мл
ВМРА	Моча	1-100	$S_i=54500 \times C_i$	0.995	90±7	0.5
ИВМРА	Моча	1-100	$S_i=64100 \times C_i$	0.998	92±8	0.5
TVR	Плазма	10-500	$S_i=1910 \times C_i$	0.998	90±10	5
TCVX	Плазма	10-500	$S_i=2080 \times C_i$	0.996	90±8	5

$S_i$  – площадь пика выбранного ионного перехода для количественной оценки соответствующего метаболита.  $C_i$  – концентрация циклогексилметилфторфосфоната в пробе, нг/мл.

## Апробация на реальных объектах (моча)

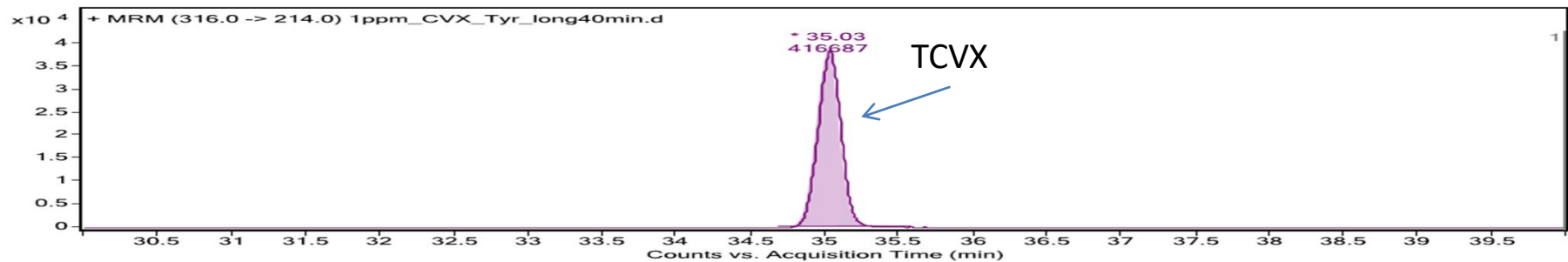
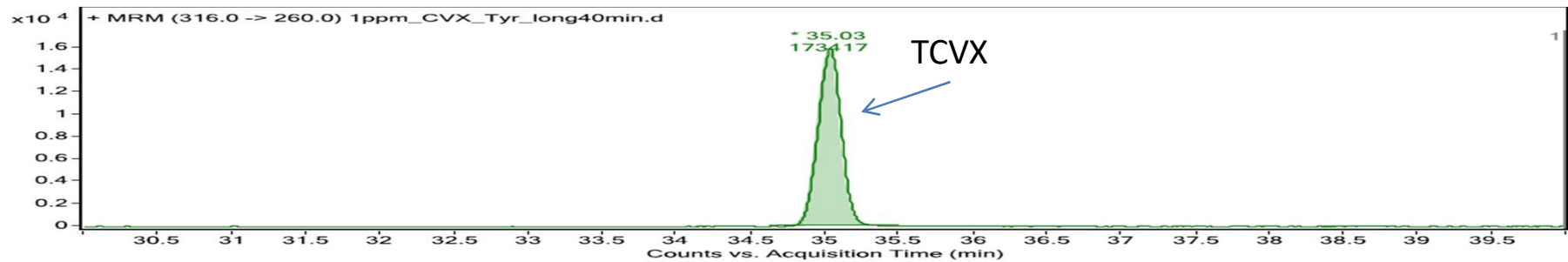


Хроматограммы по выбранным ионным реакциям при идентификации IBMPA  $m/z$  151.05 $\rightarrow$ 94.99035 (верхняя) и  $m/z$  151.05 $\rightarrow$   $m/z$  76.97979 (нижняя) пробы мочи, искусственно зараженной 50 нг/мл IBMPA

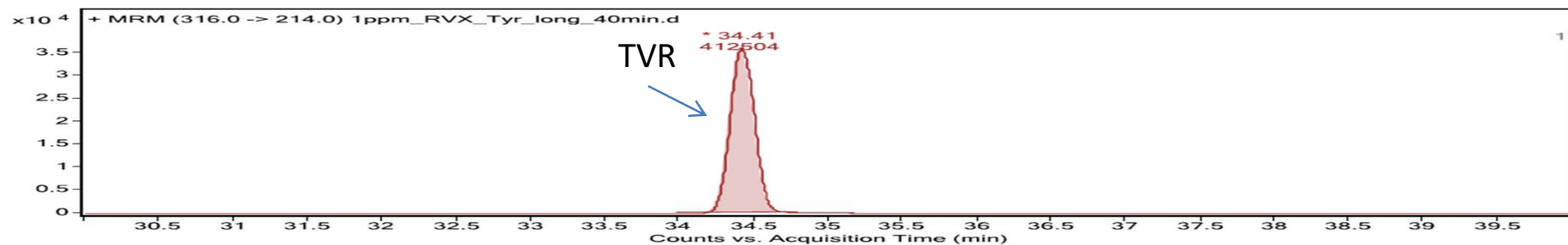
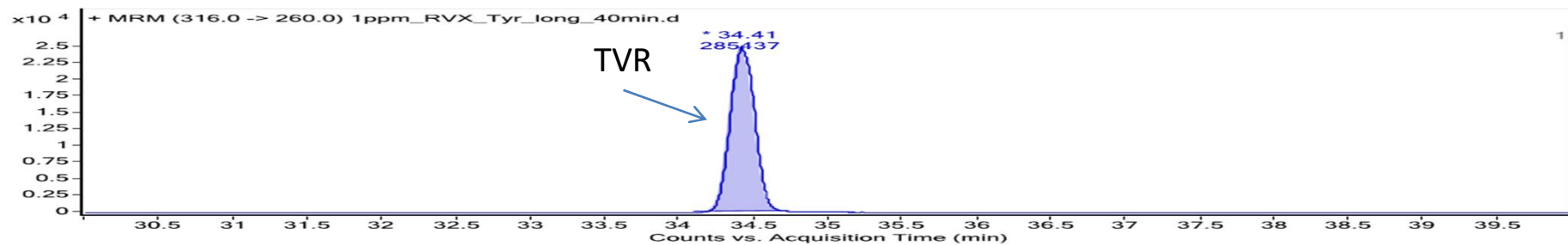
Хроматограммы по выбранным ионным реакциям при идентификации BMPA  $m/z$  151.05 $\rightarrow$ 94.99035 (верхняя) и  $m/z$  151.05 $\rightarrow$   $m/z$  76.97979 (нижняя) пробы мочи, искусственно зараженной 50 нг/мл BMPA



## Апробация на реальных объектах (плазма)



Хроматограммы по выбранным ионным реакциям при идентификации CVX (в виде TCVX)  $m/z$  316  $\rightarrow$   $m/z$  214 (верхняя) и  $m/z$  316  $\rightarrow$   $m/z$  260 (нижняя) пробы плазмы, искусственно зараженной 20 нг/мл CVX



Хроматограммы по выбранным ионным реакциям при идентификации VR (в виде TVR)  $m/z$  316  $\rightarrow$   $m/z$  214 (верхняя) и  $m/z$  316  $\rightarrow$   $m/z$  260 (нижняя) пробы плазмы, искусственно зараженной 20 нг/мл VR

## Выводы

Оптимизирован и апробирован на экспонированных *in vitro* образцах плазмы крови человека способ определения биомаркеров применения VR и CVX –тирозиновых аддуктов (TVR и TCVX), а также соответствующих кислых эфиров метилфосфоновой кислоты (IBMPA и BMPA) в моче, образующихся в соответствии с различными метаболическими процессами, методом ВЭЖХ—МС/МС высокого разрешения, который характеризуется высокой чувствительностью (0.5 – 5 нг/мл), высокой специфичностью и удовлетворительными метрологическими характеристиками. Можно полагать, что обнаружение в реальных пробах мочи и плазмы крови пострадавших данных биомаркеров V-газов однозначно указывает на факт интоксикации и обеспечивает достоверную идентификацию фосфорорганических вещества нервно-паралитического действия.

### Благодарность

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ в рамках научного проекта №19-13-00057.*